CE

DuoFLEX Cocktail
Anti-S100
Anti-Tyrosinase
Anti-Melan-A
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IK001

English

Intended use

For in vitro diagnostic use.

DuoFLEX Cocktail Polyclonal Rabbit Anti-S100, Monoclonal Mouse Anti-Human Melan-A, Clone A103, and Monoclonal Mouse Anti-Human Tyrosinase, Clone T311, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. Polyclonal Rabbit Anti-S100 labels cells expressing S100 and is useful for the identification of S100-positive neoplasms, such as malignant melanoma (1,2), Langerhans' histiocytosis (3), chondroblastoma (4), and schwannoma (5). A panel of antibodies including Polyclonal Anti-S100, Code Z0311, has been applied by the International Lymphoma Study Group for the classification of tumors of suspected histiocytic/dendritic cell type (6). Monoclonal Mouse Anti-Human Tyrosinase, Clone T311 is useful for the identification of melanocytic lesions and melanoma. Monoclonal Mouse Anti-Human Melan-A, Clone A103, is useful for the identification of melanomas (7,8) and is also applicable as a useful marker for angiomyolipomas (9). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Synonyms for antigen

Melan A: MART-1; Tyrosinase: T311; EC 1.14.18.1

Summary and explanation

S100: A multigene family of low molecular weight (MW between 9 000 and 13 000) Ca^{2+}-binding proteins. The family comprises 19 members that are differentially expressed in a large number of cell types. Thus, S100B (previously S100β) is most abundant in glial cells of the central and peripheral nervous system, in melanocytes, chondrocytes, and adipocytes, whereas S100A1 (previously S100A/S100α) is most abundant in cardiomyocytes, slow twitch skeletal muscle cells, salivary epithelial cells, and renal cells. Additionally, S100B is found in tumor cells and subpopulations of neurons, while S100A1 has also been detected in hippocampal neurons. S100A6 is expressed by fibroblasts and smooth and heart muscle cells (5).
Members of the S100 family have been implicated in the Ca^{2+}-dependent regulation of a variety of intracellular activities, e.g. protein phosphorylation, cell proliferation (including neoplastic transformation), and differentiation (10).

Tyrosinase: A copper-glycoenzyme involved in the production of melanin pigments, including both eumelanin and pheomelanin (11,12). In this process tyrosinase catalyzes the hydroxylation of L-tyrosine to L-dopa and the oxidation of L-dopa to L-dopaquinone (11,12). As a marker of melanocytic lineage, tyrosinase is localized to melanocytes which can be found on the dermal/epidermal junction of normal skin, but is not detected in other normal cells (13). Pigmented parts of the eye such as the choroid and iris also contain melanocytes. Expression of tyrosinase is also found in melanocytic lesions including benign nevi and the majority of primary and metastatic malignant melanomas, and not in non-melanocytic tumor types (13,14,15). Additionally, tyrosinase can be recognized by autologous cytotoxic T-cells from melanoma patients, and therefore tyrosinase peptides have utility in melanoma vaccines (16,17).

Melan-A: Isolated as a melanoma-specific antigen, is a transmembrane protein composed of 118 amino acids with uncertain function (7). The *Melan-A* gene was cloned from a human melanoma cell line, and its expression on melanomas is recognized by autologous cytotoxic T cells (19). Melan-A is expressed in skin, retina and the majority of cultured melanocytes and melanomas, whereas a vast variety of other tissues and cancers tested do not express Melan-A (7,18,19). However, Melan-A is expressed in angiomyolipomas (9). Along with Melan-A, seven other melanoma antigens have been identified: MAGE-1, MAGE-3, tyrosinase, gp100, gp75, BAGE-1 and GAGE-1, which are all recognized by autologous cytotoxic T cells (7).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use polyclonal rabbit and monoclonal mouse antibody cocktail provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Polyclonal Rabbit Anti-S100

Monoclonal Mouse Anti-Human Tyrosinase, Clone T311, Isotype: IgG_{2a}, kappa

Monoclonal Mouse Anti-Human Melan-A, Clone A103, Isotype: IgG_1, kappa

Immunogen

S100: S100 isolated from cow brain

Tyrosinase: Purified recombinant unglycosylated tyrosinase protein consisting of 452 amino acids of the 511 amino acid mature human tyrosinase protein (11)

Melan-A: Recombinant protein expressed in *E. coli* corresponding to Melan-A (7)

Specificity

The S100 antibody has been solid-phase absorbed with human plasma and cow serum proteins.

In Western blotting of purified human recombinant S100 proteins, the antibody labels S100B strongly, S100A1 weakly, and S100A6 very weakly. No reaction was observed with the other S100 proteins tested, S100A2, S100A3 and S100A4 (20). In indirect ELISA, the antibody shows no reaction with human plasma and cow serum.

As demonstrated by immunohistochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, the antibody cross-reacts with the S100 equivalent protein in man, cat, horse, mouse, rat, and swine.

For Anti-Tyrosinase, immunoblotting was performed using L-cells transfected with the tyrosinase gene and on four cell lines that express tyrosinase mRNA: SK-MEL-13, SK-MEL-19, SK-MEL-30 and SK-MEL-37 (11). Consistent with previous reports, a cluster of proteins ranging from 70-80 kDa was recognized by clone T311 in immunoblots of all five cell lines (11). An additional 55 kDa band was stained in blots from cell lines that are strongly reactive (SK-MEL-19) (1). Furthermore, immunoblots of untransfected L-cells and three cell lines that do not express tyrosinase mRNA (MZ2-MEL3.1, SK-MEL-187 and MZ2-MEL2.2) were negative with clone T311 (11). L-cells transfected with the tyrosinase-related protein 1, TRP-1(gp75), were also unreactive with clone T311 in immunofluorescent and immunoblotting assays, indicating this antibody does not cross react with the melanosome-associated protein, TRP-1(gp75) (11).

Anti-Melan-A antibody labels a protein doublet of 20-22 kDa in Western blotting of cell lysates from Melan-A mRNA positive cell lines, whereas no labeling is detected in Melan-A mRNA-negative cell lines (7).

In immunoprecipitates of Melan-A positive cell lines SK-MEL-13 and SK-MEL-19, the antibody labels a protein doublet of 20-22 kDa corresponding to Melan-A, whereas no precipitation is detected in Melan-A mRNA-negative melanoma cell lines (7).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2–8 ℃. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody cocktail can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004).

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide.

Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004). The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 ℃; epitope retrieval temperature and time: 97 ℃ for 20 (±1) minutes; cool down to 65 ℃. Remove Autostainer slide rack with slides from the PT Link tank and immediately dip slides into a jar/tank (e.g., PT Link Rinse Station, Code PT109) containing diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x), (Code K8007). Leave slides in Wash Buffer for 1-5 minutes.

Paraffin-embedded sections: Using aqueous mounting medium (Dako Faramount Code S3025) is the preferred coverslipping method. As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be air dried at 60 °C for 1 hour, immersed in xylene and mounted using permanent mounting medium. Alcohol should be avoided with permanent mounting as it may diminish reactivity of the red chromogen.

Before mounting, the tissue sections should not dry out during the pre-treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ DuoFLEX Doublestain System, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K6807). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: DuoFLEX2 (200 µL dispense volume) or DuoFLEX3 (300 µL dispense volume)

Autoprogram: MELct (without counterstaining) or MELcth (with counterstaining)

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in "Performance characteristics".

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). After the staining procedure has been completed, the sections must be air dried for 1 hour at 60 ℃, immersed in xylene, and mounted using per manent mounting medium. Alcohol should be avoided with permanent mounting as it may diminish reactivity of the red chromogen.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include the appendix, colon, and skin and the cells/structures should display reaction patterns as described for these tissues in "Performance characteristics" in all positive specimens.

Staining interpretation

Cells labeled by Anti-S100 antibody display red nuclear and cytoplasmic staining.

Cells labeled by Anti-Tyrosinase antibody display brown cytoplasmic and/or perinuclear staining.

Cells labeled by Anti-Melan-A antibody display brown cytoplasmic staining.

Performance characteristics

Normal tissues: Positive labeling with Anti-S100 is observed in some Langerhans' cells and melanocytes of the skin, interdigitating reticulum cells in lymph nodes, medullary epithelial reticular cells in the thymus, chondrocytes in cartilagenous tissue, adipocytes in some, but not other biopsies, myoepithelial cells in salivary glands and breast, folliculostellate cells of the pituitary gland, and Schwann cells and glial cells of nervous tissue. Weak labeling is found in epithelial cells of the mammary and sweat glands. A negative reaction with the antibody is observed in normal hepatocytes, bile duct epithelium, gall bladder epithelium, oesophagus, stomach, and small and large intestinal epithelia, renal epithelia, and urothelial and endothelial cells (21). In colon, the satellite cells of the peripheral nerves in the plexus of Auerbach show a moderate to strong nuclear and cytoplasmic staining reaction, whereas adipocytes and ganglion cells in the plexus of Auerbach show a weak to moderate nuclear and cytoplasmic staining reaction.

Anti-Tyrosinase, clone T311, was tested with a panel of 33 normal tissues using immunohistochemistry, and only skin was positive (13). In normal skin, melanocytes were immunoreactive, while basal keratinocytes of the skin remained negative (11,13).

Anti-Melan-A, Clone A103, labels skin, whereas stomach, colon, lung, liver, spleen, kidney, testis, urinary bladder, breast, ovary, smooth muscle and adipose tissues are not labelled by the antibody (7,9). The steroid-producing cells of adrenal cortex, ovary and testis have been reported to be labeled by the antibody (8).

Abnormal tissues: Of malignant melanomas, Anti-S100 labeled 31/31 (100%) conventional cutaneous, 23/24 (96%) metastatic, including 10 amelanotic, 6/6 desmoplastic, and 1/1 myxoid malignant melanomas. In 30 benign and 15 dysplastic naevi, universal homogenous labeling was seen in all cases (1). In another study of primary malignant cutaneous melanomas (2), 67/67 were positive with the antibody, including 5/5 spindle cell and desmoplastic tumors. In 27 cases of Langerhans' histiocytosis, 88.5% were labeled by the antibody, this included localized as well as disseminated disease (3). Of 30 chondroblastomas examined, all demonstrated a strong labeling of the chondroblasts with the antibody (4). Of typical benign schwannomas, 12/12 were positive with the antibody, as also 2/4 malignant schwannomas. Of neurofibromas, 6/6 showed weak expression of S100, except for some isolated cells and a number of eel-like cell processes which were distinctively positive (5). Of note is that S100 was expressed by 15 of 133 non-melanocytic primary cutaneous neoplasms, i.e. 7/16 eccrine carcinomas, 2/8 metastatic visceral carcinomas, 2/2 malignant schwannomas, and 4/5 leiomyosarcomas (2). Of primary adenocarcinomas, 24/25 (84%) ovary, 12/15 (80%) salivary gland, 28/36 (78%) endometrium, 15/23 (65%) renal, 12/20 (60%) breast, 7/28 (25%) colon/rectum, 2/10 (20%) stomach, and 2/27 (7%) lung adenocarcinomas were positively labeled by the antibody. Adenocarcinomas of the oesophagus, gallbladder, pancreas and prostate were all negative in this study. Most of the primary neoplasms that expressed S100 were also positive for this protein in metastatic foci (22). Of rhabdomyosarcomas, 7/60 (12%) were labeled by the antibody. The S100-positive tumors were also positive for vimentin and desmin (23).

Anti-Tyrosinase, Clone T311, was tested on benign and malignant melanocytic lesions and was found to label the majority of benign nevi and melanomas tested. Low tyrosinase immunoreactivity was observed in melanomas of the desmoplastic and spindle cell type (11,13,14,15). The specificity of anti-Tyrosinase for melanocytic lesions has been demonstrated by immunostaining more than 70 different non-melanocytic tumors types with no immunoreactivity found, indicating that expression of tyrosinase is restricted to cells of melanocytic lineage (13).

In metastatic melanomas, Anti-Melan-A, Clone A103, labeled 16/21 cases, showing positive homogeneous, cytoplasmic staining in >80-90% of melanoma cells, except one which displayed focal staining (7). In another study of 10 benign melanocytic nevi, 10 primary melanomas and 75 metastatic melanomas, the antibody labeled 10/10 benign melanocytic nevi, 7/10 primary melanomas and 61/75 metastatic melanomas (8). Among 111 carcinomas, mainly adenocarcinomas and squamous cell carcinomas, 40 germ cell tumors and 33 miscellaneous non-melanocytic epithelioid tumors, none were labeled by the antibody. The antibody labeled 5/5 adrenal cortical adenomas, 16/16 primary and 13/13 metastatic adrenal cortical carcinomas, and also 4/4 Leydig cell tumors of the testis and 3/4 Sertoli-Leydig cell tumors of the ovary were labeled by the antibody. In another study of 316 cases, including 21 adrenal cortical tumors, 16 metastatic carcinomas to the adrenal, 10 pheochromocytomas, and 269 extra-adrenal carcinomas, the antibody labeled 14/14 adrenal cortical adenomas, 7/7 adrenal cortical carcinomas, 0/16 metastatic carcinomas to the adrenal and 0/10 pheochromocytomas. Of the 269 extra-adrenal carcinomas, a single ovarian serous carcinoma was labeled. In a study of 18 angiomyolipomas, all 18 were labeled by the antibody (9). In another report all three angiomyolipomas tested were labeled by the antibody (8).

Français

Réf. IK001

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Le cocktail DuoFLEX, constitué de l'anticorps polyclonal de lapin anti-S100, de l'anticorps monoclonal de souris anti-Melan-A humain, clone A103, et de l'anticorps monoclonal de souris anti-tyrosinase humaine, clone T311, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est prévu pour être utilisé en immunohistochimie avec les appareils Dako Autostainer/Autostainer Plus. L'anticorps polyclonal de lapin anti-S100 marque les cellules exprimant la S100 et facilite l'identification des néoplasmes positifs à la S100, comme le mélanome malin (1, 2), l'histiocytose à cellules de Langerhans (3), le chondroblastome (4) et le schwannome (5). Un groupe d'anticorps comprenant l'anticorps polyclonal Anti-S100 (Réf. Z0311), a été appliqué par l'International Lymphoma Study Group (groupe d'étude international des lymphomes) pour la classification des tumeurs soupçonnées d'être de type histiocytaire/dendritique (6). L'anticorps monoclonal de souris anti-tyrosinase humaine, clone T311, est utile pour l'identification de lésions mélanocytaires et du mélanome. L'anticorps monoclonal de souris anti-Melan-A humain, clone A103, est utile pour l'identification de mélanomes (7, 8) et c'est également un marqueur utile des angiomyolipomes (9). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Synonymes de l'antigène

Melan-A : MART-1; tyrosinase : T311 ; EC 1.14.18.1

Résumé et explication

S100 : famille multigénique de protéines de liaison Ca^{2+} de faible poids moléculaire (MW entre 9 000 et 13 000). La famille est composée de 19 membres à l'expression différentielle dans un grand nombre de types cellulaires. Ainsi, la protéine S100B (anciennement S100β) est plus abondante dans les cellules gliales du système nerveux périphérique et central, dans les mélanocytes, les chondrocytes et les adipocytes, tandis que la S100A1 (anciennement S100A/S100α) est plus abondante dans les cardiomyocytes, les cellules des muscles striés à rythme lent, les cellules épithéliales salivaires et les cellules rénales. De plus, la S100B est présente dans les cellules tumorales et les sous-populations de neurones, alors que la S100A1 a également été détectée dans les neurones de l'hippocampe. La S100A6 est exprimée par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses et cardiaques (5).
Les membres de la famille S100 ont été impliqués dans la régulation dépendant du Ca^{2+} de diverses activités intracellulaires, par exemple la phosphorylation des protéines, la prolifération cellulaire (y compris la transformation néoplasique), et la différentiation (10).

Tyrosinase : la tyrosinase est une enzyme glycosylée contenant du cuivre, impliquée dans la production des pigments de mélanine, y compris l'eumélanine et la phéomélanine (11, 12). Lors du processus, la tyrosinase catalyse l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-dopa et l'oxydation de la L-dopa en L-dopaquinone (11, 12). En tant que marqueur de la lignée mélanocytaire, la tyrosinase est localisée dans les mélanocytes pouvant être trouvés au niveau de la jonction derme/épiderme de la peau saine mais elle n'est pas détectée dans d'autres cellules (13). Les parties pigmentées de l'œil telles que la choroïde et l'iris contiennent également des mélanocytes. La tyrosinase est également exprimée dans les lésions mélanocytaires, y compris les grains de beauté bénins et dans la majorité des mélanomes malins primaires et métastatiques mais elle n'est pas exprimée dans les types de tumeurs non mélanocytaires (13, 14, 15). De plus, la tyrosinase peut être reconnue par les cellules T cytotoxiques autologues chez des patients atteints de mélanomes, et par conséquent, les peptides de la tyrosinase sont utiles dans les vaccins contre le mélanome (16, 17).

Melan-A : le Melan-A, isolé en tant qu'antigène spécifique des mélanomes, est une protéine transmembranaire constituée de 118 acides aminés dont la fonction est incertaine (7). Le gène *Melan-A* a été cloné à partir d'une lignée cellulaire de mélanome humain, et son expression dans les mélanomes est reconnue par les lymphocytes T cytotoxiques autologues (19). Le Melan-A est exprimé dans la peau, la rétine et la majorité des mélanocytes et mélanomes mis en culture, tandis qu'une grande variété d'autres tissus et de cancers testés n'expriment pas le Melan-A (7, 18, 19). Cependant, le Melan-A est exprimé dans les angiomyolipomes (9). Outre le Melan-A, sept autres antigènes des mélanomes ont été identifiés : MAGE-1, MAGE-3, tyrosinase, gp100, gp75, BAGE-1 et GAGE-1, qui sont tous reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques autologues (7).

Se reporter aux *« Instructions générales de coloration immunohistochimique »* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures d'IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Cocktail d'anticorps polyclonal de lapin et monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Anticorps polyclonal de lapin anti-S100

Anticorps monoclonal de souris anti-tyrosinase humaine, clone T311, Isotype : IgG_{2a}, kappa

Anticorps monoclonal de souris anti-Melan-A humain, clone A103, Isotype : IgG1, kappa.

Immunogène

S100 : S100 isolée à partir de cerveau bovin

Tyrosinase : protéine tyrosinase purifiée non glycosylée recombinante, composée de 452 acides aminés provenant de la protéine tyrosinase humaine mature de 511 acides aminés (11)

Melan-A : protéine recombinante exprimée dans *E. coli* correspondant au Melan-A (7)

Spécificité

L'anticorps anti-S100 a été absorbé en phase solide en utilisant des protéines de plasma humain et de sérum bovin.

Dans les analyses par Western blot de protéines humaines recombinantes S100, l'anticorps marque fortement la S100B, faiblement la S100A1 et très faiblement la S100A6. Aucune réaction n'a été observée avec les autres protéines S100 testées, S100A2, S100A3 et S100A4 (20). Lors d'un test ELISA indirect, l'anticorps ne présente aucune réaction avec le plasma humain et le sérum bovin.

Comme le démontre l'analyse immunohistochimique de coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine, l'anticorps présente une réaction croisée avec la protéine homologue à la S100 chez l'homme, le chat, le cheval, la souris, le rat et le porc.

Dans le cas de l'anticorps anti-tyrosinase, un immunoblot a été réalisé à l'aide de cellules-L transfectées avec le gène de la tyrosinase et sur quatre lignées cellulaires exprimant l'ARNm de la tyrosinase : SK-MEL-13, SK-MEL-19, SK-MEL-30 et SK-MEL-37 (11). Conformément à des rapports antérieurs, un groupe de protéines de poids moléculaire allant de 70 à 80 kDa a été reconnu par le clone T311 dans les immunoblots des cinq lignées cellulaires (11). Une bande supplémentaire de 55 kDa était colorée dans les blots de lignées cellulaires fortement positives (SK-MEL-19) (1). En outre, les immunoblots de cellules-L non transfectées et de trois lignées cellulaires (MZ2-MEL3.1, SK-MEL-187 et MZ2-MEL2.2) n'exprimant pas l'ARNm de la tyrosinase étaient négatives au clone T311 (11). Les cellules-L transfectées par la protéine 1 liée à la tyrosinase, TRP-1(gp75), n'ont pas non plus réagi au clone T311 lors de tests d'immunofluorescence et d'immunoblot, ce qui indique que l'anticorps ne présente pas de réaction croisée avec la protéine associée aux mélanosomes, TRP-1(gp75) (11).

L'anticorps anti-Melan-A marque un doublet protéique de 20 à 22 kDa au cours d'analyses par Western blot de lysats cellulaires issus de lignées cellulaires positives en ARNm d'antigène Melan-A, tandis qu'aucun marquage n'a été constaté pour des lignées cellulaires négatives en ARNm d'antigène Melan-A (7).

Dans les immunoprécipités de lignées cellulaires SK-MEL-13 et SK-MEL-19 positives au Melan-A, l'anticorps marque un doublet protéique de 20 à 22 kDa correspondant au Melan-A, alors qu'aucune précipitation n'est détectée dans les lignées cellulaires négatives à l'ARNm du Melan-A (7).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
4. Porter un équipement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date limite de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patients. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes tissulaires incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec un démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x), (Réf. K8004).

Coupes déparaffinées : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine puis déparaffinées est recommandé à l'aide du Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link.

Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice pour la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x), (Réf. K8004). Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : température de préchauffage : 65 °C ; température et durée du déma squage d'épitope : 97 °C pendant 20 (±1) minutes ; refroidissement à 65 °C. Retirer chaque portoir à l ames Autostainer contenant les lames de la cuve du PT Link et plonger immédiatement les lames dans un récipient/une cuve (par ex., PT Link Rinse Station, Réf. PT109) contenant du tampon de lavage EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x), (Réf. K8007), dilué à température ambiante. Laisser les lames dans le tampon de lavage pendant 1 à 5 minutes.

Coupes incluses en paraffine : le milieu de montage aqueux (Dako Faramount Réf. S3025) est la méthode privilégiée d'application de lamelles de protection. Comme préparation alternative des échantillons, le déparaffinage et la restauration de l'épitope peuvent être réalisés dans le PT Link à l'aide d'une procédure modifiée. Se référer aux instructions du Guide d'utilisation du PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être séchées à l'air à 60 °C durant 1 heure, immergées dans du xylène et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent. Éviter d'utiliser de l'alcool comme milieu de montage permanent car il peut diminuer la réactivité de la solution chromogène rouge.

Avant montage, les coupes tissulaires ne doivent pas sécher lors du prétraitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique qui suit. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames Dako FLEX IHC Microscope Slides (Réf. K8020).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ DuoFLEX Doublestain System, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K6807). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : DuoFLEX2 (volume de distribution 200 µL) ou DuoFLEX3 (volume de distribution 300 µL)

Programme automatique : MELct (sans contre-coloration) ou MELcth (avec contre-coloration)

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la reprogrammation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être séchées à l'air à 60 °C durant 1 heure, immergées d ans du xylène et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent. Éviter d'utiliser de l'alcool comme milieu de montage permanent car il peut diminuer la réactivité de la solution chromogène rouge.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Le contrôle de tissu positif doit comprendre l'appendice, le côlon et la peau, et les cellules/structures doivent présenter les schémas de réaction décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs.

Interprétation de la coloration

Les cellules marquées par l'anticorps anti-S100 présentent une coloration rouge, cytoplasmique et nucléaire.

Les cellules marquées par l'anticorps anti-tyrosinase présentent une coloration brune, cytoplasmique et/ou périnucléaire.

Les cellules marquées par l'anticorps anti-Melan-A présentent une coloration brune cytoplasmique.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : le marquage positif par l'anticorps anti-S100 est observé dans certaines cellules de Langerhans et certains mélanocytes de la peau, les cellules réticulaires interdigitées dans les ganglions lymphatiques, les cellules réticulaires épithéliales médullaires dans le thymus, les chondrocytes dans le tissu cartilagineux, les adipocytes dans certaines biopsies seulement, les cellules myoépithéliales des glandes salivaires et du sein, les cellules folliculo-stellaires de l'hypophyse, ainsi que les cellules de Schwann et les cellules gliales du tissu nerveux. Une faible coloration est observée dans les cellules épithéliales des glandes mammaires et sudoripares. Une réaction négative à l'anticorps a été observée dans les hépatocytes normaux, l'épithélium du canal biliaire, l'épithélium de la vésicule biliaire, l'œsophage, l'estomac, ainsi que les épithéliums de l'intestin grêle et du gros intestin, les épithéliums rénaux et les cellules urothéliales et endothéliales (21). Dans le côlon, les cellules satellites des nerfs périphériques du plexus d'Auerbach présentent une coloration cytoplasmique et nucléaire modérée à forte, tandis que les adipocytes et les cellules ganglionnaires du plexus d'Auerbach présentent une coloration cytoplasmique et nucléaire faible à modérée.

Un panel de 33 tissus sains a été testé avec l'anticorps anti-tyrosinase, clone T311, par immunohistochimie, et seule la peau s'est avérée positive (13). Dans la peau saine, les mélanocytes étaient immunoréactifs, alors que les kératinocytes basaux de la peau sont restés négatifs (11,13).

L'anticorps anti-Melan-A, clone A103, marque la peau, alors que l'estomac, le côlon, le poumon, le foie, la rate, le rein, le testicule, la vessie, le sein, l'ovaire, les cellules de muscle lisse et les tissus adipeux ne sont pas marqués par l'anticorps (7, 9). Il a été signalé que les cellules productrices de stéroïdes du cortex surrénal, de l'ovaire et du testicule étaient marquées par l'anticorps (8).

Tissus tumoraux : parmi les mélanomes malins, 31 (100 %) mélanomes malins cutanés classiques sur 31, 23 (96 %) mélanomes malins métastatiques sur 24, dont 10 non mélaniques, 6 mélanomes malins desmoplastiques sur 6, et un (sur un) mélanome malin myxoïde ont été marqués par l'anticorps anti-S100. Sur 30 nævi bénins et 15 dysplasiques, une coloration universelle homogène a été observée dans tous les cas (1). Dans une autre étude portant sur des mélanomes malins cutanés primaires (2), 67 sur 67 (100 %) étaient positifs à l'anticorps, dont 5 tumeurs à cellules fusiformes et desmoplastiques sur 5. Dans 27 cas d'histiocytose à cellules de Langerhans, 88,5 % étaient marqués par l'anticorps, y compris des maladies localisées ainsi que disséminées (3). Sur 30 chondroblastomes examinés, tous ont présenté une forte coloration des chondroblastes avec cet anticorps (4). Pour les schwannomes bénins classiques, 12 sur 12 étaient positifs à l'anticorps, ainsi que 2 schwannomes malins sur 4. Pour les neurofibromes, 6 sur 6 ont présenté une faible expression de la S100, excepté pour certaines cellules isolées et plusieurs processus à cellules filiformes qui étaient distinctement positives (5). Il est à noter que la S100 était exprimée par 15 néoplasmes cutanés primaires non mélanocytaires sur 133, soit 7 carcinomes eccrines sur 16, 2 carcinomes viscéraux métastasiques sur 8, 2 schwannomes malins sur 2 et 4 léiomyosarcomes sur 5 (2). Parmi les adénocarcinomes primaires, 24 sur 25 (84 %) adénocarcinomes ovariens, 12 sur 15 (80 %) adénocarcinomes des glandes salivaires, 28 sur 36 (78 %) adénocarcinomes de l'endomètre, 15 sur 23 (65 %) adénocarcinomes rénaux, 12 sur 20 (60 %) adénocarcinomes mammaires, 7 sur 28 (25 %) adénocarcinomes du côlon/rectum, 2 sur 10 (20 %) adénocarcinomes de l'estomac et 2 sur 27 (7 %) adénocarcinomes pulmonaires étaient marqués positivement par l'anticorps. Les adénocarcinomes de l'œsophage, de la vésicule biliaire, du pancréas et de la prostate étaient tous négatifs dans cette étude. La plupart des néoplasmes primaires qui exprimaient la S100 étaient également positifs à cette protéine dans les foyers métastasiques (22). Pour ce qui est des rhabdomyosarcomes, 7 sur 60 (12 %) étaient marqués par l'anticorps. Les tumeurs positives à la S100 étaient également positives à la vimentine et à la desmine (23).

L'anticorps anti-tyrosinase, clone T311 a été testé sur des lésions mélanocytaires bénignes et malignes et il a marqué la majorité des grains de beauté bénins et des mélanomes testés. On a observé une faible immunoréactivité de la tyrosinase dans les mélanomes de type cellulaire fusiforme et desmoplastique (11, 13, 14, 15). La spécificité de l'anticorps anti-tyrosinase pour les lésions mélanocytaires a été démontrée en colorant plus de 70 types de tumeurs non mélanocytaires différentes n'ayant aucune immunoréactivité. Ceci indique que l'expression de la tyrosinase est limitée aux cellules provenant d'une lignée mélanocytaire (13).

Dans des mélanomes métastatiques, l'anticorps anti-Melan-A, clone A103, a marqué 16 cas sur 21, qui présentaient une coloration cytoplasmique homogène dans >80-90 % des cellules des mélanomes, à l'exception d'un cas présentant une coloration localisée (7). Lors d'une autre étude, l'anticorps a marqué 10 nævi mélanocytaires bénins sur 10, 7 mélanomes primaires sur 10 et 61 mélanomes métastatiques sur 75 (8). Sur 111 carcinomes, principalement des adénocarcinomes et des carcinomes à cellules squameuses, 40 tumeurs à cellules germinales et 33 tumeurs épithélioïdes non mélanocytaires diverses, aucun marquage par l'anticorps n'a été observé. L'anticorps a marqué 5 adénomes corticosurrénaux sur 5, 16 carcinomes corticosurrénaux primaires sur 16 et 13 carcinomes corticosurrénaux métastatiques sur 13, ainsi que 4 tumeurs des cellules de Leydig du testicule sur 4 et 3 tumeurs des cellules de Sertoli- Leydig de l'ovaire sur 4. Lors d'une autre étude portant sur 316 cas, dont 21 tumeurs corticosurrénales, 16 carcinomes métastatiques de la surrénale, 10 phéochromocytomes, et 269 carcinomes extra-surrénaux, l'anticorps a marqué 14 adénomes corticosurrénaux sur 14, 7 carcinomes corticosurrénaux sur 7, 0 carcinome métastatique de la surrénale sur 16 et 0 phéochromocytome sur 10. Parmi les 269 carcinomes extra-surrénaux, un seul carcinome séreux de l'ovaire a été marqué. Lors d'une étude, 18 angiomyolipomes sur 18 ont été marqués par l'anticorps (9). Dans un autre rapport, les trois angiomyolipomes testés ont été marqués par l'anticorps (8).

Deutsch

Code-Nr. IK001

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Der Antikörper-Cocktail DuoFLEX, der aus polyklonalem Kaninchen-Anti-S100, monoklonalem Maus-Anti-Human Melan-A, Klon A103, und monoklonalem Maus-Anti-Human-Tyrosinase, Klon T311 (Dako Autostainer/Autostainer Plus) besteht, ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Der polyklonale Kaninchen-Anti-S100-Antikörper markiert Zellen, die S100 exprimieren, und dient zur Erkennung S100-positiver Neoplasien, wie z.B. malignem Melanom (1,2), Langerhans-Zell-Histiozytose (3), Chondroblastom (4) und Schwannom (5). Die International Lymphoma Study Group hat ein Antikörper-Panel, zu dem auch Polyclonal Anti-S100, Code-Nr. Z0311 gehört, zur Klassifizierung von Tumoren verdächtiger histiozytischer/dendritischer Zellen angewandt (6). Der monoklonale Maus-Anti-Human-Tyrosinase-Antikörper, Klon T311, dient der Erkennung von Melanozytenläsionen und Melanomen. Der monoklonale Maus-Anti-Human-Melan-A-Antikörper, Klon A103, dient der Erkennung von Melanomen (7,8) und ist ebenfalls ein hilfreicher Marker für Angiomyolipome (9). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Synonyme für das Antigen

Melan-A MART-1; Tyrosinase: T311; EC 1.14.18.1

Zusammenfassung und Erklärung

S100: eine Multigenfamilie von Ca^{2+}-bindenden Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht (MW: 9.000–13.000). Die Familie umfasst 19 Mitglieder, die differenziell in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert werden. S100B (früher S100β) ist daher am häufigsten in Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in Melanozyten, Chondrozyten und Adipozyten anzutreffen, während S100A1 (früher S100A/S100α) am häufigsten

in Kardiomyozyten, leicht zuckenden Skelettmuskelzellen, Speichel-Epithelzellen und Nierenzellen auftritt. Zusätzlich tritt S100B in Tumorzellen und Subpopulationen von Neuronen auf, während S100A1 auch in Hippocampus-Neuronen nachgewiesen wurde. S100A6 wird durch Fibroblasten sowie Zellen glatter Muskulatur und des Herzmuskels exprimiert (5).

Die Mitglieder der S100-Familie wurden mit der Ca^{2+}-abhängigen Regulierung zahlreicher intrazellulärer Vorgänge in Verbindung gebracht, z. B. der Protein-Phosphorylierung, der Zellproliferation (inkl. neoplastische Transformation) und der Differenzierung (10).

Tyrosinase: ein an der Produktion von Melaninpigmenten, einschließlich Eumelanin und Pheomelanin, beteiligtes Kupfer-Glykoenzym (11,12). Hierbei katalysiert die Tyrosinase die Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-Dopa sowie die Oxidation von L-Dopa zu L-Dopaquinon (11,12). Als Marker für den melanozytischen Ursprung kommt Tyrosinase auf den Melanozyten aus dem Bereich der dermo-epidermalen Verbindung gesunder Haut vor, nicht jedoch in anderen gesunden Zellen (13). Pigmentierte Bereiche der Augen wie Choroidea oder Iris enthalten ebenfalls Melanozyten. Eine Tyrosinase-Expression liegt ferner in melanozytischen Läsionen wie benignen Naevi, bei der Mehrzahl der primären und metastatisierenden malignen Melanome und nicht bei nicht-melanozytischen Tumortypen vor (13,14,15). Außerdem wird die Tyrosinase durch autologe zytotoxische T-Zellen von Melanompatienten erkannt, weshalb Tyrosinasepeptide in Impfstoffen gegen Melanome eingesetzt werden (16,17).

Melan-A: isoliert als ein melanomspezifisches Antigen, ist es ein Transmembranprotein mit ungeklärter Funktion, das aus 118 Aminosäuren besteht (7). Das Melan-A-Gen wurde aus einer menschlichen Melanomzelllinie geklont, und seine Expression auf Melanomen wird von autologen zytotoxischen T-Zellen erkannt (19). Melan-A wird auf Zellen der Haut, der Netzhaut und dem Großteil der Melanozyten und Melanome aus Kultur exprimiert, während der weit überwiegende Teil anderer untersuchter Gewebe und Karzinome Melan-A nicht exprimiert (7,18,19). Melan-A wird jedoch in Angiomyolipomen exprimiert (9). Neben Melan-A wurden noch sieben weitere Melanomantigene identifiziert: MAGE-1, MAGE-3, Tyrosinase, gp100, gp75, BAGE-1 ind GAGE-1. Diese werden alle von autologen zytotoxischen T-Zellen erkannt (7).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger Cocktail aus polyklonalem Kaninchen- und monoklonalem Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L Natriumazid enthält.

Polyklonaler Kaninchen-Anti-S100

Monoklonaler Maus-Anti-Human-Tyrosinase, Klon T311, Isotyp: IgG_{2a}, kappa

Monoklonaler Maus-Anti-Human-Melan-A, Klon A103, Isotyp: IgG_1, kappa

Immunogen

S100: Aus Rinderhirn isoliertes S100

Tyrosinase: Gereinigtes, rekombinantes, nicht-glykosyliertes Tyrosinaseprotein aus 452 Aminosäuren des aus insgesamt 511 Aminosäuren bestehenden, reifen, humanen Tyrosinaseproteins (11)

Melan-A: Rekombinantes Protein, in *E. coli* exprimiert und Melan-A entsprechend (7)

Spezifität

Der S100-Antikörper wurde einer Festphasen-Absorption mit menschlichen Plasmaproteinen und mit Serumproteinen vom Rind unterzogen.

Beim Western-Blotting von gereinigten, menschlichen, rekombinanten S100-Proteinen markiert der Antikörper S100B stark, S100A1 schwach und S100A6 sehr schwach. Bei den anderen getesteten S100-Proteinen, S100A2, S100A3 und S100A4, wurde keine Reaktion beobachtet (20). Beim indirekten ELISA-Verfahren zeigt der Antikörper keine Reaktion mit Humanplasma und Rinderserum.

Durch immunhistochemische Untersuchungen an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten wurde eine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit dem S100-äquivalenten Protein von Mensch, Katze, Pferd, Maus, Ratte und Schwein nachgewiesen.

Bei der Anti-Tyrosinase erfolgte Immunblotting an mit dem Tyrosinase-Gen transfizierten L-Zellen sowie den vier Tyrosinase-mRNA exprimierenden Zelllinien SK-MEL-13, SK-MEL-19, SK-MEL-30 und SK-MEL-37 (11). In Übereinstimmung mit früheren Berichten erkannte Klon T311 in den Immunblots aller fünf Zelllinien einen Cluster von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 70–80 kDa (11). Eine weitere 55-kDa-Bande wurde in Blots starker reaktiver Zelllinien (SK-MEL-19) (1) gefärbt. Darüber hinaus waren Immunblots nicht transfizierter L-Zellen sowie die drei keine Tyrosinase-mRNA exprimierenden Zelllinien (MZ2-MEL3.1, SK-MEL-187 und MZ2-MEL2.2) mit Klon T311 negativ (11). Ferner blieben in Immunfluoreszenz- und Immunblottingtests auch mit dem tyrosinaseähnlichen Protein 1, TRP-1 (gp75), transfizierte L-Zellen mit Klon T311 unreaktiv; ein Anzeichen dafür, dass dieser Antikörper nicht mit dem melanosomassoziierten Protein TRP-1 (gp75) kreuzreagiert (11).

Der Anti-Melan-A-Antikörper markiert ein Proteinpaar von 20–22 kDa beim Western-Blotting von Zelllysaten aus Melan-A-mRNA-positiven Zelllinien, während in Melan-A-mRNA-negativen Zelllinien keine Markierung nachgewiesen werden konnte (7).

In den Immunpräzipitaten der Melan-A-positiven Zelllinien SK-MEL-13 und SK-MEL-19 markiert der Antikörper ein Melan-A entsprechendes Proteinpaar mit einem Gewicht von 20–22 kDa, während in Melanom-Zelllinien, welche Melan-A-mRNA-negativ sind, keine Präzipitation nachgewiesen wird (7).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Anwendung durch Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Der Antikörper-Cocktail eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Es ist eine Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER-Verfahren) erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) erzielt werden.

Entparaffinierte Schnitte: Die Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte sollte mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) erfolgen. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch.

Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) durchführen. Für PT Link sollten die folgenden Parameter verwendet werden: Vorwärmtemperatur: 65 °C; Temperatur und Zeit für Epitopdemaskierung: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen. Das Autostainer-Objektkträgergestell mit den Objektträgern aus dem PT Link-Behälter herausnehmen und die Objektträger sofort in einen Behälter (z.B. PT Link Rinse Station, Code-Nr. PT109) mit verdünntem, auf Zimmertemperatur gebrachtem EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x), (Code-Nr. K8007) eintauchen. Die Objektträger für 1–5 Minuten im Wash Buffer belassen.

Paraffineingebettete Schnitte: Die bevorzugte Eindeckmethode ist die Verwendung eines wässrigen Eindeckmediums (Dako Faramount, Code-Nr. S3025). Alternativ können Entparaffinierung und Epitopdemaskierung im PT Link unter Verwendung eines modifizierten Verfahrens durchgeführt werden. Weitere Informationen finden Sie im PT Link-Benutzerhandbuch. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte bei 60 °C für 1 Stunde luftgetrocknet werden, in Xylol getaucht und mit einem permanenten Eindeckmedium eingedeckt werden. Beim permanenten Eindecken sollte Alkohol vermieden werden, da es die Reaktionsfähigkeit des roten Chromogens einschränken kann.

Vor dem Eindecken und während der Vorbehandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Als Visualisierungssystem wird EnVision™ DuoFLEX Doublestain System (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K6807) empfohlen. Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: DuoFLEX2 (200 µL Abgabevolumen) oder DuoFLEX3 (300 µL Abgabevolumen)

Autoprogram: MELct (ohne Gegenfärbung) oder MELcth (mit Gegenfärbung)

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte bei 60 °C für 1 Stunde luftgetrocknet werden, in Xylol getaucht und mit einem permanenten Eindeckmedium eingedeckt werden. Beim permanenten Eindecken sollte Alkohol vermieden werden, da es die Reaktionsfähigkeit des roten Chromogens einschränken kann.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe sollte Appendix, Kolon und Haut enthalten und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen.

Auswertung der Färbung

Mit dem Anti-S100-Antikörper markierte Zellen weisen eine rote nukleäre und zytoplasmatische Färbung auf.

Mit dem Anti-Tyrosinase-Antikörper markierte Zellen weisen eine braune zytoplasmatische und/oder perinukleäre Färbung auf.

Mit dem Anti-Melan-A-Antikörper markierte Zellen weisen eine braune zytoplasmatische Färbung auf.

Leistungsmerkmale

Gesunde Gewebe: Positive Markierungen mit Anti-S100 werden in einigen Langerhans-Zellen und Melanozyten der Haut, interdigitierenden Retikulumzellen in Lymphknoten, medullären Retikulumepithelzellen im Thymus, Chondrozyten im Knorpelgewebe, Adipozyten in einigen, aber nicht allen Biopsien, Myoepithelzellen in den Speicheldrüsen und in der Brustdrüse, follikulostellaren Zellen der Hypophyse sowie Schwann-Zellen und Gliazellen des Nervengewebes beobachtet. Schwache Markierungen treten in Epithelzellen der Brust- und Schweißdrüsen auf. Eine negative Reaktion mit dem Antikörper wird in gesunden Hepatozyten, Gallengang- und Gallenblasenepithelien, in der Speiseröhre und im Magen, in Dünn- und Dickdarmepithelien, Nierenepithelien sowie in Urothel- und Endothelzellen beobachtet (21). Im Dickdarm zeigen die Satellitenzellen der peripheren Nerven im Auerbach-Plexus eine mäßige bis starke nukleäre und zytoplasmatische Farbreaktion, während Adipozyten und Ganglienzellen im Auerbach-Plexus eine schwache bis mäßige nukleäre und zytoplasmatische Farbreaktion zeigen.

Anti-Tyrosinase, Klon T311, wurde mit einem Panel von 33 gesunden Geweben immunhistochemisch untersucht, wobei nur Hautgewebe eine positive Reaktion zeigte (13). In gesunder Haut waren die Melanozyten immunreaktiv, die basalen Keratinozyten der Haut blieben hingegen negativ (11,13).

Anti-Melan-A, Klon A103, markiert Hautproben, während Proben von Magen, Dickdarm, Lunge, Leber, Milz, Niere, Hoden, Harnblase, Brust, Eierstöcken, glatter Muskulatur und Fettgewebe dagegen nicht markiert werden (7,9). Die steroidproduzierenden Zellen von Nebennierenrinde, Eierstöcken und Hoden wurden Berichten zufolge durch den Antikörper markiert (8).

Pathologische Gewebe: Von den malignen Melanomen markierte Anti-S100 31/31 (100%) konventionellen kutanen, 23/24 (96%) metastatischen (darunter 10 amelanotischen), 6/6 desmoplastischen und 1/1 myxoiden malignen Melanomen. In 30 benignen und 15 dysplastischen Naevi wurde in allen Fällen eine universale homogene Markierung beobachtet (1). In einer anderen Studie primärer, maligner, kutaner Melanome (2) waren 67/67 (100%) positiv mit dem Antikörper, darunter 5/5 Spindelzellen und desmoplastische Tumore. In 27 Fällen von Langerhans-Zell-Histiozytose (lokalisiert oder verstreut) wurden 88,5% durch den Antikörper markiert (3). Von 30 untersuchten Chondroblastomen zeigten alle eine starke Markierung der Chondroblasten mit dem Antikörper (4). Von typischen benignen Schwannomen waren 12/12 positiv mit dem Antikörper, ebenso 2/4 maligne Schwannome. Von Neurofibromen zeigten 6/6 eine schwache Expression von S100, mit Ausnahme einiger isolierter Zellen und einiger aalähnlicher Zellprozesse, die deutlich positiv waren (5). Erwähnenswert ist, dass S100 von 15 von 133 nichtmelanozytischen, primären, kutanen Neoplasmen exprimiert wurde, und zwar von 7/16 ekkrinen Karzinomen, 2/8 metastatischen viszeralen Karzinomen, 2/2 malignen Schwannomen und 4/5 Leiomyosarkomen (2). Von den primären Adenokarzinomen wurden bei 24/25 (84%) der Eierstöcke, 12/15 (80%) der Speicheldrüsen, 28/36 (78%) des Endometriums, 15/23 (65%) der Niere, 12/20 (60%) der Brust, 7/28 (25%) des Dickdarms/Rektums, 2/10 (20%) des Magens und 2/27 (7%) der Lunge Adenokarzinome durch den Antikörper positiv markiert. Adenokarzinome von Speiseröhre, Gallenblase, Pankreas und Prostata waren in dieser Studie alle negativ. Die meisten der primären Neoplasmen, die S100 exprimierten, waren auch für dieses Protein in metastatischen Herden positiv (22). Von Rhabdomyosarkomen wurden 7/60 (12 %) durch den Antikörper markiert. Die S100-positiven Tumore waren auch für Vimentin und Desmin positiv (23).

Anti-Tyrosinase, Klon T311, wurde an benignen und malignen melanozytischen Läsionen getestet. Es markierte die meisten untersuchten benignen Naevi und Melanome. Eine nur geringe Tyrosinase-Immunreaktivität wurde bei desmoplastischen und Spindelzellmelanomen beobachtet (11,13,14,15). Die Spezifität von Anti-Tyrosinase für melanozytische Läsionen wurde durch Immunfärbungen an über 70 verschiedenen, nicht-melanozytischen Tumortypen aufgezeigt, die durchweg keine Immunreaktivität aufweisen, was darauf hindeutet, dass die Tyrosinase-Expression auf Zellen melanozytischen Ursprungs beschränkt ist (13).

Bei metastatischen Melanomen wurden 16/21 Fällen durch Anti-Melan-A, Klon A103, markiert und zeigten eine positive homogene zytoplasmatische Färbung in über 80–90 % der Zellen. Nur in einem Fall kam es zu einer örtlich begrenzten Färbung (7). In einer weiteren Studie mit 10 benignen Melanozyten-Naevi, 10 primären und 75 metastatischen Melanomen markierte der Antikörper 10/10 Fällen der benignen Melanozyten-Naevi, 7/10 der primären und 61/75 der metastatischen Melanome (8). Von 111 Karzinomen, hauptsächlich Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen, 40 Keimzelltumoren und 33 diversen epitheloiden Nicht-Melanozyten-Tumoren wurde kein einziger Fall durch den Antikörper markiert. Der Antikörper markierte 5/5 Adenomen der Nebennierenrinde, 16/16 primären und 13/13 metastatischen Nebennierenrindenkarzinomen sowie 4/4 Leydig-Zelltumoren des Hodens und 3/4 Sertoli-Leydig-Zelltumoren der Eierstöcke. In einer weiteren Studie mit 316 untersuchten Fällen, darunter 21 Nebennierenrindentumore, 16 in die Nebenniere metastasierende Karzinome, 10 Phäochromozytome und 269 extraadrenale Karzinome, markierte der Antikörper 14/14 Adenomen der Nebennierenrinde, 7/7 Karzinomen der Nebennierenrinde, 0/16 metastatischen Karzinomen der Nebenniere und 0/10 Phäochromozytomen. Von den übrigen 269 extraadrenalen Karzinomen wurde nur ein einziger Fall eines serösen Eierstock-Karzinoms markiert. In einer Studie mit 18 Angiomyolipomen wurden alle 18 Fälle durch den Antikörper markiert (9). Ein weiterer Bericht schildert 3 untersuchte Angiomyolipome, welche ausnahmslos durch den Antikörper markiert wurden (8).

References
Bibliographie
Literaturhinweise

1. Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labeling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. Histochem J 2000; 32:475-81
2. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. J Cutan Pathol 1988; 15:201-7
3. Ye F, Huang S-W, Dong H-J. Histiocytosis X. S-100 protein, peanut agglutinin, and transmission electron microscopy study. Am J Clin Pathol 1990; 94:627-31
4. Edel G, Ueda Y, Nakanishi J, Brinker KH, Roessner A, Blasius S, et al. Chondroblastoma in bone. A clinical, radiological, light and immunohistochemical study. Virchows Arch A Pathol Anat 1992; 421:355-66
5. Gould VE, Moll R, Moll I, Lee I, Schwechheimer K, Franke WW. The intermediate filament complement of the spectrum of nerve sheath neoplasms. Lab Invest 1986; 55:463-74
6. Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, Banks P, Campo E, Chan JKC, et al. (review). Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. Histopathology 2002; 41:1-29
7. Chen Y-T, Stockert E, Jungbluth A, Tsang S, Coplan KA, Scanlan MJ, et al. Serological analysis of Melan-A (MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. Proc Natl Acad Sci 1996;93:5915-9
8. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K, et al. An anti-Melan-A monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. Am J Surg Pathol 1998;22:595-602
9. Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Chen Y-T, Stockert T, et al. Expression of melanocyte-associated markers gp-100 and Melan-A/MART-1 in angiomyolipomas. Virchows Arch 1999;434:429-35
10. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type (review). Biochim Biophys Acta 1999; 1450:191-231
11. Chen YT, Stockert E, Tsang S, Coplan KA, Old LJ. Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(18):8125–8129
12. Garcia-Borron JC, Solano F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. Pigment Cell Res 2002; 15(3):162–173
13. Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K, Kolb D, Stockert E, Chen YT, Old LJ, Busam K. T311-an anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. Pathol Res Pract 2000; 196(4):235–242
14. Clarkson KS, Sturdgess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). J Clin Pathol 2001; 54(3):196–200
15. Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Boni R, Dummer R. Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. J Cutan Pathol 1998; 25(4):204–209
16. Slingluff CL Jr, Petroni GR, Yamshchikov GV, Barnd DL, Eastham S, Galavotti H, Patterson JW, Deacon DH, Hibbitts S, Teates D, Neese PY, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Woodson EM, Wiernasz CJ, Merrill P, Gibson J, Ross M, Engelhard VH. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. J Clin Oncol 2003; 21(21):4016–4026
17. Zajac P, Oertli D, Marti W, Adamina M, Bolli M, Guller U, Noppen C, Padovan E, Schultz-Thater E, Heberer M, Spagnoli G. Phase I/II clinical trial of a nonreplicative vaccinia virus expressing multiple HLA-A0201-restricted tumor-associated epitopes and costimulatory molecules in metastatic melanoma patients. Hum Gene Ther 2003; 14(16):1497–1510
18. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Schneider J, Traversari C, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. J Exp Med 1994;180:35-42
19. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. Proc Natl Acad Sci 1994;91:3515-9
20. Ilg EC, Schäfer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. Int J Cancer 1996; 68:325-32
21. Vanstapel M-J, Gatter KC, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Desmet VD. New sites of human S-100 immunoreactivity detected with monoclonal antibodies. Am J Clin Pathol 1986; 85:160-8
22. Herrera GA, Turbat-Herrera EA, Lott RL. S-100 protein expression by primary and metastatic adenocarcinomas. Am J Clin Pathol 1988; 89:168-76
23. Coindre J-M, de Mascarel A, Trojani M, de Mascarel I, Pages A. Immunohistochemical study of rhabdo-myosarcoma. Unexpected staining with S100 protein and cytokeratin. J Pathol 1988; 155:127-32

REF Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	Consult instructions for use *Consulter les instructions d'utilisation* *Gebrauchsanweisung beachten*
Manufacturer Fabricant Hersteller	LOT Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
EC REP Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU		IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum

PT0039/Rev C

Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

Edition 03/09